

日本産貝類必須アミノ酸の微生物定量とその検討

村田 希久・吉田 正子・宮本 悌次郎

STUDIES ON THE MICROBIOLOGICAL ASSAY OF THE ESSENTIAL AMINO ACIDS IN SHELL-FISH IN JAPAN

By KIKU MURATA, MASAKO YOSHIDA AND TEIJIRO MIYAMOTO

食品をそのまま水解してその必須アミノ酸を微生物定量に供する際の食品水解条件を米粉と魚粉について検討し、米粉の Methionine 値を除いては一応満足すべき値の得られることを前報で報告した。

今回は更に日本産貝類の必須アミノ酸 Phenylalanine, Valine, Leucine, Isoleucine, Lysine, Threonine, Methionine, Tryptophan 値を求めるべく実験を行った。

念のため極少量の脂肪を含む食品でも脱脂が必要であるかどうかを明らかにするため、卵黄と脱脂卵黄についての各必須アミノ酸測定値を比較し、両値に著しい差のないことを確めた上で実験した。

なお、はまぐり、かき、あかがい、あさりについては乾燥粉末試料をそのまま水解して求めた全アミノ酸値と、同粉末のトリクロール酢酸（以下TCA）沈澱蛋白質中のアミノ酸ならびに乾燥粉末を水浸出した遊離アミノ酸値との和を比較した結果、Tryptophan を除く他の必須アミノ酸においては両値に著しい差はないが、後者の値は処理過程におけるロスなどのためか幾分低く1~2の例外を除いては前者に対する割合は72~93%であった。しかし Tryptophan 値は試料そのままを水解した液について測定した値が著しく高くその割合は57%を示した。以上の結果から約10種の日本産貝類の乾燥粉末をそのまま水解して微生物定量によって求めた必須アミノ酸の値は Tryptophan 以外は一応妥当な値と認め、ここに検討結果と併せて報告する。

実験方法

I) 定量方法

Tryptophan の定量は⁽²⁾福住らによる前報告により、Tryptophan 以外の必須アミノ酸の定量は宮本らの前報⁽¹⁾によった。すなわち田村らの処方によるアミノ酸合成培地を用い、使用菌として、Lysine, Methionine, Threonine の定量には *Leuconostoc mesenteroides* P-60, Isoleucine, Leucine, Phenylalanine, Valine の定量には *Lactobacillus arabinosus* 17-5 を用い 18~24時間培養濁度法を採用し、Tryptophan の定量には *Streptococcus faecalis* R を用い 72時間培養酸滴定法によった。

II) 試料の調製

貝類を殻からはずし身汁共或いは身のみをホモゲナイザーにかけ、均等となったものを秤量し、通

風乾燥機で60~70°C に十数時間充分乾燥し、再び秤量し水分の減少量を明らかにした。更に乳鉢で粉末状に均等として試料とした。各試料の窒素含量を Semi-micro-kjeldahl 法によって求めた上でアミノ酸定量のための水解に供した。

なお卵黄と脱脂卵黄については、そのままできるだけ均等としたものについて窒素を測定した上、一定量を水解に供した。

Ⅲ) TCAによる試料中の蛋白質抽出法

前項で得た貝の乾燥粉末試料2gに5% TCA 溶液 200ml を加え還流冷却器をつけて1時間半アスベスト上で沸騰をつづけ、遠沈して上層を除き、更に水を加えて遠沈し、残渣をアルコールならびにエーテルで洗滌、遠沈して上層を除き、沈澱部を乾燥し、乳鉢で均等に粉末状とし、その窒素含量を求めて後、水解に供した。

Ⅳ) 遊離アミノ酸抽出法

上の乾燥粉末試料2gに蒸留水 100ml を加え pH6.8 に調製し、還流冷却器をつけて アスベスト上に1時間沸騰せしめ、遠沈し上清を分離し一定容とした上で濾過して試料とした。

Ⅴ) 試料の加水分解

1. 卵黄と脱脂卵黄の場合 卵黄0.2g と脱脂卵黄の同量にそれぞれ 4N HCl 5ml を加え120°C, 15lb に6時間加熱し、一旦濾過、水洗し、濾液と洗液を合し、pH を6.8に調製後100ml とし、再び濾過して分析に供した。

2. 貝類乾燥粉末の場合 乾燥粉末試料0.1g に4N HCl 5ml を加え 120°C, 15lb に6時間加熱し、以後前同様に処理して分析に供した。また Tryptophan 測定のためには前報福住らの方法⁽²⁾により乾燥試料0.2g に cysteine 200mg, 4N NaOH 15ml を加え 120°C に10時間加熱 水解し、6N HCl で pH 6.8 とし濾過、水洗後洗液共に全容 100ml とし分析に供した。

3. TCA処理蛋白質の場合 前同様に処理した。

Ⅵ) 再 検 率 の 測 定

乾燥粉末試料もしくは TCA 沈澱蛋白質の粉末試料各 0.1g に第1表に示すような量の各必須アミ

第1表 再検率試験時各試料への各アミノ酸添加量

	乾燥試料 0.1 g に対する添 加量 (mg)	TCA沈澱蛋白質 0.1 g に対する 添加量 (mg)
Leucine	1	2
Isoleucine	1	2
Valine	2	4
Phenylalanine	1	2
Threonine	1	2
Methionine	1	1
Lysine	2	4
Tryptophan	0.2	1

ノ酸を添加したものを調製し、非添加の試料と平行して HCl もしくは cysteine と NaOH と共に前述水解条件と同様に処理し、適当に稀釈してアミノ酸の定量に供し、各アミノ酸の再検率を求めた。

実 験 結 果

Ⅰ) 卵黄と脱脂卵黄の必須アミノ酸値

各試料窒素1g当りの Tryptophan 以外の必須

アミノ酸測定値は第2表に示すようで卵黄と脱脂卵黄のアミノ酸値には大差が見られず、その差は1～4%で、微生物定量法の誤差範囲内にあることを認めた。

Ⅱ) 加水分解時のアミノ酸再検率

実験の項Ⅵ)に述べたように、はまぐりの乾燥試料ならびに TCA 沈澱蛋白質を水解する過程における添加アミノ酸の再検率を求めた結果は第3表に示すようで、Threonine の再検率が約 20% 高く出たが、その他のアミノ酸においては両試料ともに 81～110% の再検率を示した。勿論これは遊離アミノ酸の再検率であるから、水解前の蛋白体アミノ酸の再検状態を正確に示すものではないが、前報告⁽¹⁾にも示したように3時間水解で既に6～9時間水解値の80%以上が遊離アミノ酸になっている点から考えて、本実験において得た再検率は、試料中のアミノ酸の安定度の大体の状況を示すものであろう。

なお試料アミノ酸検液を微生物定量に供する際の各アミノ酸再検率は何れも 100% 前後であった。

第3表 試料加水分解時のアミノ酸再検率

試料 アミノ酸	再 検 率 %	
	乾燥試料	TCA沈澱蛋白質
Leucine	102	97
Isoleucine	95	103
Valine	85	81
Phenylalanine	110	110
Threonine	120	114
Methionine	83	83
Lysine	86	91
Tryptophan	80	86

第2表 卵黄と脱脂卵黄のアミノ酸測定
結果の比較 (アミノ酸mg/Ng)

試料 アミノ酸	卵黄	脱脂卵黄	差(%)
Leucine	455	444	2
Isoleucine	318	321	1
Valine	325	338	4
Phenylalanine	252	255	1
Threonine	297	301	1
Methionine	134	132	1
Lysine	538	563	4

Ⅲ) 貝類アミノ酸値とその検計

前項の条件で貝類乾燥粉末を水解して微生物定量に供して得た Tryptophan 以外の各必須アミノ酸値は第4表と第5表に示すようで、同一種類の貝でも多少個体差ならびに測定時の誤差などにもより幾分異なる値を示したが、全般的にみて Leucine と Isoleucine の値が文献値のそれよりかなり低値を示すことが観察された。これらアミノ酸の水解過程における再検率は充分であっても

乾燥試料であるため特にこれらアミノ酸の水解が不充分となる恐れをも考慮して、次に第6表のような4種の貝類の乾燥試料について、特に実験の部Ⅲに示すようにTCAにより試料中の蛋白質を抽出したものについて各必須アミノ酸の定量を行い、これを試料100g当りに換算したものと、同一乾燥試料について実験の部Ⅳに示すように遊離アミノ酸を抽出しそのアミノ酸を測定した上、試料100g当りに換算し、これらを合計した値Aと、乾燥粉末試料をそのまま水解して測定したアミノ酸値を試料100g当りに換算した値Bとを比較した。なおA値のB値に対する割合を求めるとTryptophanでは試料を直接水解した場合のB値が著るしく高く、それらの割合はわずか57%で満足すべき結果ではないが、これは主にTCA処理におけるTryptophanの分解によるものと思われる。一方その他の必須アミノ酸では72～112%でその間に多少の開きはあるが、乾燥粉末試料をそのまま水解したためにTCA処理蛋白質よりも水解が著るしく悪くなるとは考えられない結果を得た。従って第4表ならびに第5表

第4表 貝類の必須アミノ酸含量測定値と文献値 (g/N16g)

アミノ酸 試 料		Leucine	Iso-leucine	Valine	Phenyl-alanine	Threonine	Methionine	Lysine
あ さ り <i>Venerupis Philippinarum</i>	測定値	5.4 6.1	3.9 4.4	5.7 3.8	3.1 2.9	4.0 3.6	1.8 1.8	6.7 7.2
	文献値(4)	8.8	6.3	4.9	3.4	4.4	2.5	8.2
し じ み <i>Corbicula leana</i>	測定値	5.6 5.4	4.7 4.3	6.7 4.8	3.4 3.8	4.5 5.0	1.9 2.4	7.5 9.6
	文献値(4)	9.1	8.0	4.4	4.7	5.0	2.5	7.4
は ま ぐ り <i>Meretrix meretrix lusoria</i>	測定値	5.7 6.2	4.9 4.0	7.0 3.5	3.6 2.1	4.9 4.4	2.0 1.8	7.7 7.6
	文献値(4) 文献値(5)	7.9 2.5, 3.1	5.7 2.8, 2.7	4.2 3.6, 3.5	3.7 2.9, 4.5	3.9 2.8, 6.1	2.3 9.6, 2.1	7.6 3.1, 6.8
か き <i>Ostrea gigas</i>	測定値	5.2 4.4	3.2 2.9	4.5 2.2	3.0 2.4	3.7 3.0	1.8 1.4	5.9 4.5
	文献値(4)	8.3	8.3	4.9	4.7	4.2	2.8	7.1
あ か が い <i>Anadara inflata</i>	測定値	4.7 7.2	3.4 3.0	4.3 4.5	2.8 3.8	3.9 4.0	1.6 2.6	6.0 10.1
貝 柱 (はたてがい)	測定値	5.6 2.9	3.5 3.7	4.0 2.9	2.6 2.4	4.0 3.2	2.0 1.9	7.1 7.2
さ ざ え <i>Turbo cornutus</i>	筋肉 測定値	6.1 6.1	3.3 3.7	3.5 3.4	2.5 2.7	3.8 3.4	2.0 2.1	6.4 6.4
	内臓 測定値	5.6 5.6	3.6 3.8	4.1 4.0	3.5 3.7	4.7 4.2	1.2 1.8	6.0 5.9
ば い <i>Babylonia japonica</i>	筋肉 測定値	5.0	2.8	3.9	2.3	3.6	1.9	5.9
	内臓 測定値	7.9 9.1	4.4 4.3	5.9 5.0	4.0 3.5	5.1 4.6	2.4 2.9	7.4 8.8
あ わ び <i>Haliotis gigantea</i>	筋肉 測定値	3.6	2.6	2.9	2.0	2.8	0.9	4.4
	内臓 測定値	3.6	3.0	4.1	2.9	4.1	0.6	3.8

第5表 乾燥粉末試料100g中のアミノ酸量 (g)

アミノ酸 試 料		Leucine	Iso-leucine	Valine	Phenyl-alanine	Threonine	Methionine	Lysine
あ さ り {		2.7 3.2	2.0 2.3	2.9 2.0	1.5 1.5	2.0 1.9	0.9 0.9	3.4 3.8
し じ み {		2.6 2.3	2.2 1.9	3.1 2.1	1.6 1.6	2.1 2.2	0.9 1.1	3.5 4.2
は ま ぐ り {		2.1 2.9	1.8 1.9	2.5 1.6	1.3 1.0	1.8 2.1	0.7 0.9	2.8 3.6
あ か が い {		2.9 5.1	2.1 2.1	2.6 3.1	1.7 2.7	2.4 2.8	1.0 1.8	3.7 7.1
か き {		3.1 2.2	1.9 1.4	2.7 1.1	1.8 1.2	2.2 1.5	1.1 0.7	3.5 2.2

(第5表つづき)

試料 \ アミノ酸		Leucine	Iso-leucine	Valine	Phenyl-alanine	Threonine	Methionine	Lysine
貝 柱	{	4.3	2.7	3.1	2.0	3.1	1.5	5.4
		2.5	3.1	2.4	2.1	2.7	1.6	6.1
さ ざ え	{ 筋肉	4.5	2.4	2.5	1.9	2.8	1.4	4.7
		4.4	2.8	2.5	2.0	2.4	1.5	4.8
	{ 内臓	2.6	1.7	1.9	1.6	2.2	0.6	2.8
		2.6	1.8	1.9	1.7	1.9	0.8	2.7
ば い	{ 筋肉	3.3	1.9	2.6	1.5	2.4	1.2	3.9
	{ 内臓	3.7	2.1	2.7	1.9	2.4	1.1	3.5
		4.2	2.0	2.4	1.6	2.2	1.3	4.1

第6表 貝類アミノ酸値 前処理をした場合としない場合の値の比較

試料	アミノ酸	遊離 アミノ酸g/100g	蛋白体 アミノ酸g/100g	計 A	全アミ ノ酸g/100g B	$\frac{A}{B} \times 100$ (%)
は ま ぐ り	Leucine	0.5	2.1	2.6	2.9	90
	Isoleucine	0.3	1.4	1.7	1.9	90
	Valine	0.3	0.9	1.2	1.6	75
	Phenylalanine	0.2	0.6	0.8	1.0	75
	Threonine	0.3	1.5	1.8	2.1	85
	Methionine	0.2	0.6	0.8	0.9	89
	Lysine	0.4	2.5	2.9	3.6	80
	Tryptophan	0.01	0.4	0.4	0.7	57
か き	Leucine	0.07	1.5	1.6	2.2	73
	Isoleucine	0.04	1.1	1.1	1.4	79
	Valine	0.16	0.7	0.9	1.1	82
	Phenylalanine	0.07	1.0	1.1	1.2	92
	Threonine	0.12	1.0	1.1	1.5	73
	Methionine	0.07	0.5	0.6	0.7	86
	Lysine	0.14	1.6	1.7	2.2	78
あ か が い	Leucine	0.01	4.2	4.2	5.1	82
	Isoleucine	0.01	2.6	2.6	2.1	112
	Valine	0.01	2.5	2.5	3.1	81
	Phenylalanine	0.01	2.1	2.1	2.7	78
	Threonine	0.01	2.1	2.1	2.8	76
	Methionine	0.01	1.3	1.3	1.8	72
	Lysine	0.02	5.2	5.2	7.1	73
あ さ り	Leucine	0.33	2.2	2.5	3.2	78
	Isoleucine	0.23	1.5	1.7	2.3	74
	Valine	0.25	1.2	1.5	2.0	75
	Phenylalanine	0.18	1.2	1.4	1.5	93
	Threonine	0.20	1.3	1.5	1.9	79
	Methionine	0.13	0.7	0.8	0.9	89
	Lysine	0.29	3.1	3.4	3.8	90

にあげた各種貝類の各アミノ酸値は一応信頼し得るものと考え。そこで実用上の便利のため、貝類新鮮物、むき身とエキス100g、もしくはむき身、貝柱、貝肉各100g当りの Tryptophan を除く各必須アミノ酸含量平均値を第7表に示し参考に供する。なお Tryptophan 値については将来の研究にゆずる。

第7表 生鮮物各100g当りの必須アミノ酸値 (g)

アミノ酸 試 料	Leucine	Iso-leucine	Valine	Phenyl-alanine	Threonine	Methionine	Lysine
あ さ り※	0.37	0.27	0.30	0.19	0.24	0.12	0.45
あ し じみ※	0.25	0.20	0.26	0.16	0.21	0.09	0.38
は ま ぐ り※	0.30	0.23	0.27	0.15	0.24	0.10	0.39
あ か が い(1)	0.40	0.29	0.37	0.23	0.33	0.13	0.51
(2)	1.59	0.65	0.96	0.83	0.87	0.55	2.21
か 貝 き 柱	0.57	0.36	0.39	0.32	0.41	0.19	0.61
	0.64	0.56	0.52	0.39	0.55	0.30	1.11
さ ざ え { 筋肉	1.12	0.65	0.63	0.48	0.65	0.37	1.18
内臓	0.55	0.37	0.41	0.35	0.43	0.15	0.59
ば い { 筋肉	1.03	0.59	0.81	0.47	0.75	0.39	1.22
内臓	1.66	0.86	1.07	0.73	0.96	0.51	1.59
あ わ び { 筋肉	0.87	0.61	0.70	0.47	0.67	0.21	1.05
内臓	0.46	0.37	0.51	0.36	0.52	0.07	0.48

※あさり、しじみ、はまぐり等については殻共調理して摂取する場合を考慮して、汁、身共100g当りのアミノ酸値を求めた。

あかがい (1)は汁、身共100gの値

(2)はむき身100g当りの値

要 約

日本産貝類の必須アミノ酸含量を微生物定量法によって求めるに当り、先ず乾燥粉末試料を脱脂する必要があるかないかを特に脂肪含量の高い卵黄を用いて予備試験し、前以て脱脂の必要のないことを確め、つづいて試料はまぐりについて乾燥粉末試料ならびにそのTCA処理蛋白の水解過程における各必須アミノ酸の再検率を求め、Threonineの再検率が何れにおいても高い傾向を示すほかは両試料において81~110%であったので本水解条件は一応満足すべきものと考え、乾燥粉末試料を直接水解して求めたアミノ酸値を文献値と比較した。その結果、IsoleucineとLeucine値が文献値よりかなり低く、水解不充分の恐れもあると考え、数種貝類につき遊離アミノ酸値とTCA処理蛋白質を水解して求めたところTryptophanを除く他の必須アミノ酸では貝100g当りのアミノ酸値の計と、乾燥粉末試料を直接水解して求めた貝類100g当りのアミノ酸値に著るしい差がなかったので乾燥粉末を直接水解してそのアミノ酸を微生物定量に供し得るものと考え、約10種の日本産貝類新鮮物についてTryptophan以外の必須アミノ酸値を第7表に掲げた。

本研究遂行のために多大なる御援助と御鞭達を賜った日本食品アミノ酸組成とその栄養価に関する研究委員会委員長児玉桂三教授に対し、またアミノ酸定量用培地および標準用アミノ酸を御分譲下された阪大赤堀二郎教授ならびに田辺製薬株式会社に深謝の意を表す。また Tryptophanの定量をしていただいた帝塚山短大福住講師に感謝する。

文 献

- (1) 宮本悌次郎, 吉田正子, 福住悦子, 村田希久: 栄養と食糧, **12**, 265 (1959)
- (2) 福住悦子, 村田希久: *Micro Bioassay*, No. 1, 21 (1960)
- (3) 田村学造, 角田俊直, 桐村二郎, 宮沢滋: 農化, **26**, 464 (1952)
- (4) 田村盈之輔, 西原綾子, 磯部しづ子, 松野信郎, 馬場春夫: 昭和31年度国立栄養研究所研究報告, P.28 (1956)
- (5) Richard J. Block: "Amino Acids Handbook", Charles C. Thomas Publisher, Illinois, P.230 (1956)

SUMMARY

The samples of dried powdered shell-fish or TCA precipitated protein from shell-fish were hydrolysed with a solution of 4*N* hydrochloric acid or a solution of 2*N* sodium hydroxide in the presence of cysteine by heating for 6 hrs or 10 hrs at 120° C, 15lb., the precipitates filtered off, and rinsed with water. The combined filtrate was adjusted to pH 6.8, made to a constant volume, and filtered to obtain a clear solution for analysis of the amino acids by the microbiological assay.

The recovery percentages of the essential amino acids added to the dried powder or to the TCA precipitated protein were 81~110%, except that of threonine 114% or 120%.

The values determined by the above procedures of dried powdered shell-fish (*A*) were compared with those obtained from TCA precipitated protein from shell-fish plus the free essential amino acids (*B*), and it was observed that the values (*B*) against (*A*) were 73~112% except that of tryptophan.

The results appear to indicate that the values of the essential amino acids, except tryptophan, obtained from a solution prepared from dried powdered shell-fish are fairly close to true values.

The values of the essential amino acids, except tryptophan, of nine kinds of shell-fish and of some of their viscera were shown and compared with those given in the literature.